

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Kazutami SAKAMOTO, et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/055,951

EXAMINER:

FILED: January 28, 2002

FOR: PROMOTER FOR PRODUCTION OF NITRIC OXIDE OR NITRIC OXIDE SYNTHASE, AND COSMETIC OR PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

APPLICATION NUMBER

MONTH/DAY/YEAR

JAPAN

2001-020446

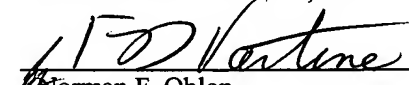
January 29, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon
Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Frederick D. Vastine
Registration No. 27,013



国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

B-840/TK-US
10/055,951

#1/

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 1月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-020446

出 願 人

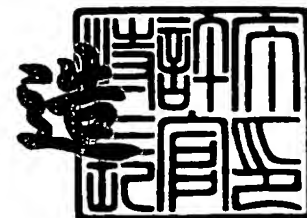
Applicant(s):

味の素株式会社
株式会社ノエビア

2001年 7月27日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3066313

【書類名】 特許願

【整理番号】 MA43861

【提出日】 平成13年 1月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
アミノサイエンス研究所内

【氏名】 坂本 一民

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
アミノサイエンス研究所内

【氏名】 渡部 乙比古

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県八日市市妙法寺町 7 7 4 - 1 3

【氏名】 正木 仁

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000135324

【氏名又は名称】 株式会社ノエビア

【代理人】

【識別番号】 100064687

【弁理士】

【氏名又は名称】 霜越 正夫

【電話番号】 03-5205-2384

【選任した代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 049401

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607453

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 一酸化窒素合成酵素産生促進剤および化粧料若しくは医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類を有効成分として含有してなることを特徴とする生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤。

【請求項2】 ピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類に加えてアルギニンをも有効成分として含有してなることを特徴とする請求項1記載の生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤。

【請求項3】 有効成分としてピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類を含有してなることを特徴とする生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物。

【請求項4】 有効成分としてピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類に加えてアルギニンをも含有してなることを特徴とする請求項3記載の生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、有効成分として、ピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類、またはこれに加えてアルギニンをも含有することを特徴とする生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤および生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) については、その生理学的

、薬理的な役割が注目され研究が行われてきている。NOは、生体内で、NO合成酵素（Nitric Oxide Synthase, NOS）によって、アルギニンを基質として生成される。このNOSは、生体の状態が正常であるときにも存在する構成酵素のcNOSと、ある刺激によって多量に産生される誘導酵素のiNOSの2つに分類される。cNOSが生成するNOの濃度と比較すると、iNOSが生成するNO濃度は2から3オーダー程度高く、iNOSの方が極端に多量のNOを生成することが知られている。

【0003】

iNOSが生成する場合のようにNOが多量に発生した場合には、活性酸素と反応して生体外来微生物やガン細胞などを攻撃する一方で、炎症や組織障害を起こすことが知られている。一方、cNOSが生成する場合のようにNO量が少ない場合はサイクリックGMP（cGMP）を介し、生体に対する種々の保護的作用、すなわち血管拡張作用、血行改善、抗血小板凝集作用、抗菌作用、抗がん作用、消化管吸収促進、腎機能調節、神経伝達作用、勃起（生殖）、学習、食欲などを担うと考えられる。

【0004】

従来は、生体内で多量に発生するNOに由来すると考えられる炎症や組織障害を防止する目的で、NOSの酵素活性の阻害剤の検討がなされてきている。しかしながら、NOSの酵素活性を促進し、適度にNOを産生させることで、生体に対する種々の保護的作用を発現させる目的でNOS（特にcNOS）の酵素活性（または発現量）を促進することについては検討されてこなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

前項記載の従来技術の背景下に、本発明はNOの産生量を適切なレベルにたもつために、cNOSの酵素活性（または発現量）を促進し、かつ、iNOSの酵素活性（または発現量）は促進しない物質を見出し、これを利用して優れた一酸化窒素合成酵素産生促進剤、延いては一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、前項記載の課題を解決するために鋭意検討した結果、ピロリドンカルボン酸およびピロリドンカルボン酸塩、さらにはピロリドンカルボン酸誘導体が、またはこれらと併用された場合のアルギニンが、そのような物質として優れた効果を持つことを見出し、このような知見に基いて本発明を完成するにいたった。

【0007】

すなわち、本発明は、有効成分として、ピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類、またはこれに加えてアルギニンをも含有することを特徴とする生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤および生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

本発明に用いるピロリドンカルボン酸としては、D-ピロリドンカルボン酸（D-2-ピロリドン-5-カルボン酸）およびL-ピロリドンカルボン酸（L-2-ピロリドン-5-カルボン酸）を挙げることができる。また、両方の光学異性体が任意の比率で混合したもの（これにはDL-ピロリドンカルボン酸（DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸）も包含される）を用いることもできる。さらには、本発明に用いるピロリドンカルボン酸は、遊離体でもよいし、アルギニン、リジン、金属イオン、トリエタノールアミンなどと塩を形成していてもよい。また、酸無水物、エステル、アミド、ペプチド、蛋白質などの誘導体の形態のものでよい。

【0010】

本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤は、生体内においてcNOSの発現量を増大させ、延いては一酸化窒素の産生を促進する効果をもつ一方で、iNOSの発現量を増大させる効果は実質的に持たない。

【0011】

本発明の生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤は、NOの基質として知られるアルギニンなどの他の物質と組み合わせることで、必要に応じて効果を増大させることも可能である。ここに、アルギニンはL-アルギニンでもD-アルギニンでもよく、また両方の光学異性体が任意の比率で混合したもの（これにはDL-アルギニンも包含される）でもよい。

【0012】

本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤、またはその有効成分であるピロリドンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類若しくはこれに加えてアルギニン（以下、一酸化窒素合成酵素促進剤（広義）と総称する）は、これを医薬品や化粧料等に配合してこれらを血管拡張作用、血行改善、抗血小板凝集作用、抗菌作用、抗がん作用、消化管吸収促進、腎機能調節、神経伝達作用、勃起（生殖）促進、学習促進、食欲増進などの機能をもつ医薬品や化粧料等に調製することができる。

【0013】

本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤を化粧料に配合して使用する場合（生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物）、このような化粧料組成物の用途については、特に制限はないが、化粧料の例えば皮膚の血行改善または血行促進用成分として用いることができる。より具体的には、頭髮用、頭皮用、顔面用、ボディ用などの化粧料や入浴剤、霜やけ防止剤、等の成分として用いるのに適している。

【0014】

本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤を化粧料として提供する場合、その化粧料組成物中の含有濃度としては特に制限はないが、好ましくは0.01重量%から20重量%、より好ましくは0.05重量%から10重量%、さらに好ましくは0.1重量%から5重量%である。

【0015】

このような化粧組成物の剤型としては、ローション、乳剤、ゲル剤、クリーム、軟膏等を挙げることができる。

【0016】

本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤を医薬品に配合して使用する場合（生体内一酸化窒素産生促進医薬組成物）、例えば、血行の不良や悪化の防止、さらにはこれらの予防用の医薬組成物あるいは皮膚の血行改善または促進などのための医薬組成物に用いることができる。さらにこの組成物から医療用の組成物や化粧料などを得ることも可能である。

【0017】

医薬組成物における本発明の一酸化窒素合成酵素産生促進剤の含有濃度には特に制限はないが、好ましくは0.01重量%から20重量%、より好ましくは0.05重量%から10重量%、さらに好ましくは0.1重量%から5重量%である。

【0018】

このような医薬組成物の剤型としては、適宜、液剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、錠剤等の経口投与薬、あるいは静脈内投与、動脈内投与の注射剤などにもすることもできる。

【0019】

また、経皮吸収効果のあるものと併用することなどにより、外用剤としても使用可能である。外用剤として使用する場合、そのような医薬組成物には、外用剤基剤に通常用いられる油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、低級アルコール類、高級アルコール類、多価アルコール類、エステル類、界面活性剤、水溶性高分子等を含むことができる。さらに、他の皮膚細胞賦活剤、抗炎症剤、活性酸素消去剤、保湿剤、紫外線吸収剤、防腐防黴剤、香料等を含むことができる。

【0020】

外用剤の剤型としては、適宜、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム、軟膏等の剤型とすることができる。

【0021】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例により更に説明する。

【0022】

比較例1～3および実施例1～4

血管内皮細胞を10%牛胎児血清(FBS)含有DMEM培地(Dulbecco変法MEM)を用いて培養した。但し、フェノールレッドおよびL-アルギニン無添加の培地とした。この培地で24時間培養した。24時間培養後に、L-2-ピロリドン-5-カルボン酸とL-アルギニンを下記第1表に示すように添加量を変えて添加した。さらに、24時間培養した。

【0023】

その後の培養上清中の二酸化窒素を測定することにより、一酸化窒素の産生量を求めた。二酸化窒素は、Griess法を用いて測定した。培養液中の細胞数を測定して細胞 10^3 個当たりの一酸化窒素生成量をnmolで表した。なお、陰性対照としては、アルギニンもピロリドンカルボン酸も含まないもの(比較例1)、およびアルギニンを単独に含むもの(比較例2)を用いた。また、陽性対照としては、アルギニンとグリコール酸を含むもの(比較例3)を用いた。

【0024】

結果を下記第1表に示す。表中、L-Arg、L-PCAおよびGAは、それぞれ、L-アルギニン、L-ピロリドンカルボン酸およびグリコール酸を意味する。

【0025】

【表 1】

第 1 表

	培地中各成分の濃度(mM)			一酸化窒素生成量 (nmol/10 ⁵ cell)
	L-Arg	L-PCA	GA	
比較例1	0	0	0	1. 1
比較例2	5	0	0	1. 9
比較例3	5	0	1 0	2. 9
実施例1	0	1 0	0	1. 4
実施例2	5	2. 5	0	2. 1
実施例3	5	5	0	3. 4
実施例4	5	1 0	0	4. 1

【0 0 2 6】

第 1 表に示した結果から、ピロリドンカルボン酸とアルギニンの両者を培地に添加して場合には、従来の一酸化窒素の生成に対して促進効果があるとして知られているグリコール酸とアルギニンの組み合わせよりも同じ添加濃度（1 0 mM）で比較したときに、一酸化窒素の生成量がより増大することが明らかになった。さらに、ピロリドンカルボン酸単独でも一酸化窒素産生促進効果を呈し、その添加量が増大するにつれて一酸化窒素の生成量が増大することが明らかになった。

【0 0 2 7】

実施例 5

血管内皮細胞を 1 0 % 牛胎児血清（F B S）含有 DMEM を用いて培養した。この培地で 2 4 時間培養した。2 4 時間培養後に L - ピロリドンカルボン酸を所定濃度（後掲第 3 表参照）となるように添加した培地でさらに 2 4 時間培養してから、RNA を抽出した。RNA の逆転写には、逆転写キット（G I B C O 製）を用いて c D N A を作成して P C R に供した（R T - P C R）。プライマーとしては、下記第 2 表に示すものを用いた。P C R の条件としては、denaturing を 9 5 ° C で 3 0 秒、annealing を 5 9 ° C で 6 0 秒、extension を 7 3 ° C で 9 0 秒にして、4 0 サイクル実施した。

【0028】

【表2】

第2表

cNOS	sense	5'-GTG ATG GCG AAG CGA GTG AAG-3'
	anti-sense	5'-CCG AGC CCG GGC GCG CAG AAC-3'
iNOS	sense	5'-TTG GAG GCA AAC AGC ACA TTC A-3'
	anti-sense	5'-GGG TTG GGG GTG TGG TGA TGA TGT-3'

【0029】

上記のように、RT-PCRを用いて、cNOSとiNOSのメッセンジャーRNAの発現量を調べた。iNOSは本実験においては検出されなかったのに対して、cNOSが検出され、さらにその量は、下記第3表に示すように、ピロリドンカルボン酸の添加量に依存して増加する傾向が認められた。表中のL-PCAはL-ピロリドンカルボン酸を意味する。

【0030】

【表3】

第3表

L-PCA添加濃度(mM)	cNOS発現量(相対比)
1.0	1.00
2.5	1.25
5.0	1.40
10.0	1.75

【0031】

因みに、ピロリドンカルボン酸とアルギニン塩についてL体の代わりにD体を用いた場合、両者を組み合わせた場合などについて実験を行ったが同様の結果が得られた。

【0032】

実施例6：O/W型乳剤

下記の原材料組成及び製法によりO/W型乳剤を調製した。

【0033】

原材料組成：(1)スクワラン 5.0 (重量%、以下同じ。)、(2)白色ワセリン 2.0、(3)ミツロウ 0.5、(4)ソルビタンセスキオレエート 0.8、(5)ポリオキシエチレンオレイルエーテル(20EO) 1.2、(6)パラオキシ安息香酸メチル 0.1、(7)プロピレングリコール 5.0、(8)精製水 57.1、(9)カルボキシビニルポリマー(1.0重量%水溶液) 20.0、(10)水酸化カリウム 0.1、(11)エタノール 5.0、(12)L-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩(10重量%水溶液) 3.0、および(13)香料 0.2。

【0034】

製法：(1)～(5)の油相成分を混合し75℃に加熱して融解し、均一化した。一方、(6)～(8)の水相成分を混合し、溶解して75℃に加熱し、これに前記融解均一化した油相成分を添加して予備乳化した。この予備乳化物に(9)を添加した後ホモミキサーにて均一に乳化し、さらに(10)を加えてpHを調整した。これを冷却後40℃にて(11)～(13)を添加し、混合し、均一化した。

【0035】

目の隈を気にする20代から40代の女性10名(内5名は貧血の自覚症状を有していた)を一群とし、上記の組成の組成物を用いて使用試験を行った。また、同様の成員からなる他の一群に対して原材料(12)のL-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩を水に置換した組成物を使用して比較試験を行った(比較例4)。2種類の組成物をそれぞれブラインドで1日2回、2か月の間目の隈部に塗布使用させ、2週間後及び2か月後の目の隈の改善状況を調査した。

【0036】

本発明の組成物を使用した被験者は、2か月後には全て目の隈が改善されており、特に貧血症状を有する被験者においては、2週間後には目の隈が改善されていた。それに対して、L-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩を水に置換した比較例4の組成物においては、有意な目の隈改善効果は認められなかった。

【0037】

なお、本実施例 6 における 2 種の組成物については、上記使用試験期間中に含有成分の析出、分離、凝集、変臭、変色といった製剤の状態変化は全く見られなかった。また、本発明による組成物使用群および比較例の組成物使用群において、皮膚刺激性反応や皮膚感作性反応を示したパネラーは存在しなかった。

【 0 0 3 8 】

実施例 7 : ローション

(1) エタノール 10.0 (重量%、以下同じ。)(2) ヒドロキシエチルセルロース 1.0、(3) L-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩 (10 重量%水溶液) 3.0、(4) パラオキシ安息香酸メチル 0.1、および(5) 精製水 85.9 を混合し均一とすることでローションを調製した。

【 0 0 3 9 】

実施例 8 : O/W 型乳剤

下記の原材料組成及び製法により O/W 型乳剤を調製した。

【 0 0 4 0 】

原材料組成：(1) ステアリン酸 0.2 (重量%、以下同じ。)、(2) セタノール 1.5、(3) ワセリン 3.0、(4) 流動パラフィン 7.0、(5) ポリオキシエチレン (10 EO) モノオレイン酸エステル 1.5、(6) 酢酸トコフェロール 0.5、(7) グリセリン 5.0、(8) パラオキシ安息香酸メチル 0.1、(9) トリエタノールアミン 1.0、(10) 精製水 76.2、および(11) L-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩 (10 重量%水溶液) 4.0。

【 0 0 4 1 】

製法：(1) ~ (6) の油相成分を混合し、70℃に加熱して均一に融解し、そのまま70℃に保った。一方、(7) ~ (10) の水相成分を混合し、加熱して均一とし、70℃とした。この水相成分に前記油相成分を攪拌しながら徐々に添加して乳化し、冷却した後40℃にて(11)を添加し、混合した。

【 0 0 4 2 】

実施例 9 : 水性ゲル剤

下記の原材料組成及び製法により水性ゲル剤を調製した。

【0043】

原材料組成：(1) 精製水 84.3 (重量%、以下同じ。)、(2) カルボキシビニルポリマー 0.5、(3) ジプロピレングリコール 10.0、(4) パラオキシ安息香酸メチル 0.1、(5) 水酸化カリウム 0.1、および(6) L-ピロリドンカルボン酸-DL-アルギニン塩 (10重量%水溶液) 5.0。

【0044】

製法：(1) に (2) を均一に溶解した後、これに (3) に (4) を溶解して添加し、次いで (5) を加えて増粘させ、最後に (6) を添加した。

【0045】

実施例 10：W/O 乳化型軟膏

下記の原材料組成及び製法により W/O 乳化型軟膏を調製した。

【0046】

原材料組成：(1) 流動パラフィン 30.0 (重量%、以下同じ。)、(2) マイクロクリスタリンワックス 2.0、(3) ワセリン 5.0、(4) ジグリセリルオレイン酸エステル 5.0、(5) プロピレングリコール 3.0、(6) パラオキシ安息香酸メチル 0.1、(7) L-ピロリドンカルボン酸-L-アルギニン塩 0.5、および(8) 精製水 54.4。

【0047】

製法：予め混合し 70℃ に加熱溶解した (1) ～ (4) に、同様に加熱溶解均一化した (5) ～ (8) を徐々に添加して均一に乳化し、混合しながら冷却した。

【0048】

【発明の効果】

本発明によれば、優れた生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤、延いてはこれを利用した生体内一酸化窒素産生促進化粧料若しくは医薬組成物が容易に提供されることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 NOの産生量を適切なレベルにたもつために、cNOSの酵素活性を促進し、かつ、iNOSの酵素活性は促進しない物質を見出し、これを利用して優れた一酸化窒素合成酵素産生促進剤、延いては一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物を提供すること。

【解決手段】 有効成分として、ピドリロンカルボン酸、ピロリドンカルボン酸塩およびピロリドンカルボン酸誘導体のうちから選ばれる少なくとも1種類、またはこれに加えてアルギニンをも含有することを特徴とする生体内一酸化窒素合成酵素産生促進剤および生体内一酸化窒素産生促進化粧料組成物または医薬組成物。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日	1991年 7月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名	味の素株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000135324]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地の1
氏 名 株式会社ノエビア